1 自然发酵泡菜汁中植物乳杆菌的分离鉴定与体外益生特性研究[1]

2 侯 颖 王维宇 牛明福 马丽苹 秦翠丽 宫 强

3 （河南科技大学食品与生物工程学院，河南省食品原料工程技术研究中心，洛阳市微生物发

4 酵工程技术研究中心，洛阳 471023）

5 摘 要：利用 MRS 固体培养基从自然发酵的泡菜汁中分离到 1 株优势乳酸菌，将其命名为

6 菌株 R1，经 16S rRNA 基因序列分析，并结合生理生化特性和糖发酵试验将其鉴定为植物

7 乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）。菌株 R1 具有很强的产酸能力，24 h 内可使 MRS 液体

8 培养基 pH 从 6.14 降为 3.59。菌株 R1 的发酵上清液对痢疾志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、铜

9 绿假单胞菌、鸡肠炎沙门氏菌、大肠埃希氏菌均有很好的抑制作用。体外益生试验表明，菌

10 株 R1 能耐受 0.3%的胆盐、pH 3.0 的酸度以及 60 ℃、30 min 的热处理，对人工胃液和人工

11 肠液也有很好的耐受性。菌株 R1 对头孢类和青霉素类抗生素较敏感，对诺氟沙星、卡那霉

12 素、链霉素等抗生素不敏感。

13 关键词：植物乳杆菌；抑菌活性；分离；鉴定；益生特性

14 中图分类号：TS255.7 文献标识码：A 文章编号：

15 乳酸菌是一种广泛分布于自然界而且普遍应用于食品、医药、饲料等领域的益生菌[1-2]，植

16 物乳杆菌是乳酸菌的一种，属于乳杆菌科中的乳杆菌属，是同型发酵乳酸菌[3]。大量研究表

17 明植物乳杆菌具有降低血清中胆固醇浓度[4-7]、抑制肠道病原菌增殖[8-11]、降低食品中亚硝酸

18 盐浓度等益生作用[12-14]。利用植物乳杆菌及其代谢产物作为抑制人或动物常见病原菌的微生

19 物态调节剂，在食品安全、动物养殖等领域受到广泛重视[15-17]。自然发酵的蔬菜制品是植物

收稿日期：2017-03-24

基金项目：国家自然科学基金项目（31400098）；河南科技大学创新能力培育基金项目（2014ZCX025）；河南科技大学青年基金项目（2013QN019）；河南科技大学人才基金项目（13480031）；河南科技大学大学生研究训练计划（2015067）

作者简介：侯 颖（1976—），女，辽宁海城人，副教授，博士，从事微生物资源开发与应用研究。E-mail: houying76@126.com

20 乳杆菌分离筛选的良好来源，已有大量优良的菌株从自然发酵的蔬菜中分离筛选到[6,12,18]。

21 本研究以自然发酵的泡菜汁为原料，对其中具有抑菌活性的植物乳杆菌进行分离，并对

22 其分类地位进行鉴定。此外，益生菌要在动物机体内发挥其益生作用，必须能够耐受胃肠道

23 中胃酸和胆汁等一系列不良环境[17,19-20]。本研究对分离到的植物乳杆菌的体外益生特性亦进

24 行了测定，以期为利用其开发益生菌制剂奠定基础。

25 1 材料与方法

26 1.1 材料、培养基与试剂

27 1.1.1 分离材料

28 以甘蓝为主要原料自然发酵的泡菜汁。

29 1.1.2 供试病原菌

30 大肠埃希氏菌（GIM 1.299）、痢疾志贺氏菌（GIM 1.236）、金黄色葡萄球菌

31 （CGMCC:29213）、鸡肠炎沙门氏菌（CGMCC:21510）、铜绿假单胞菌（GIM 1.443）病

32 原菌菌株为本实验室保存。

33 1.1.3 培养基与试剂

34 MRS 培养基和牛肉膏蛋白胨培养基的配制参见文献[21]。

35 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、$MgCl_2$ 等 PCR 反应试剂为日本 TaKaRa 公司产品，猪胆盐为

36 上海蓝季科技发展有限公司产品，胃蛋白酶（1:3000）、胰蛋白酶（1:250）为美国 Amresco

37 公司产品，抗生素滤纸片为杭州微生物试剂有限公司产品，其余试剂均为分析纯。

38 1.2 仪器与设备

39 UV-2000 紫外可见分光光度计[尤尼柯（上海）仪器有限公司]、HQY-C 恒温振荡摇床（金

40 坛市鸿科仪器厂）、PHS-3C 型 pH 计（上海雷磁仪器厂）、T Professional Trio PCR 仪（德

41 国 Biometra 公司）、Gel Doc XR+凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）、DX50 显微镜（日

42 本 Olympus 公司）。

43 1.3 方法

44 1.3.1 乳酸菌的分离

45 以无菌操作吸取自然发酵泡菜汁 10 mL 加入到装有 90 mL 无菌水的三角瓶中，即为 10^{-1}
46 稀释液，振荡混匀后吸取 1 mL 转移至装有 9 mL 无菌水的试管中，制成 10^{-2} 稀释液，此后
47 依次制得 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 和 10^{-6} 稀释液，最后分别吸取 0.2 mL 10^{-4}、10^{-5} 和 10^{-6} 稀释液涂布
48 于 MRS 固体培养基上，将平板倒置于 37 ℃培养 48 h 后，挑取平板上生长数量占优势的乳
49 酸菌株作为进一步研究的对象，将其命名为菌株 R1。

50 1.3.2 菌株 R1 的鉴定

51 1.3.2.1 16S rRNA 基因序列分析

52 采用细菌 DNA 提取试剂盒提取菌株 R1 的总 DNA，然后对菌株 R1 的 16S rRNA 基因
53 序列进行扩增[22]。PCR 扩增的引物为细菌 16S rRNA 基因通用引物：27f
54 （5′-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3′）和 1492r
55 （5′-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3′）。PCR 反应体系（50 μL）：菌株 R1 总 DNA
56 1 μL，10×*Taq* 聚合酶反应缓冲液 5 μL，Mg^{2+}（25 mmol/μL）4 μL，dNTP Mixture（20 mmol/μL）
57 4 μL，上、下游引物（25 pmol/μL）各 2 μL，*Taq* DNA 聚合酶（5 U/μL）0.5 μL，灭菌双蒸
58 水 31.5 μL。PCR 扩增条件：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸
59 1.5 min，共 30 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min，10 ℃保温 10 min。得到的 PCR 产物经 0.75%
60 琼脂糖凝胶电泳检测后送南京金斯瑞生物工程有限公司测序。

61 菌株 R1 系统发育地位的确定：根据测定的菌株 16S rDNA 序列，在 NCBI 数据库
62 （http://www.ncbi.nlm.nih.gov）中进行在线比对分析，并在 RDP 数据库
63 （http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp）中下载与菌株 R1 16S rRNA 序列同源的序列，用 BioEdit
64 软件以 ClustalW 功能进行校准排齐，最后利用 MEGA 6.0 软件，采用邻接(NJ)法，1 000 次
65 Bootstrap 构建系统发育树。

66 1.3.2.2 生理生化指标测定

67 参照《常见细菌系统鉴定手册》[23]对分离的菌株进行过氧化氢酶试验、硝酸盐还原试

68 验、明胶液化试验、V-P 试验、甲基红试验（MR 试验）、糖发酵试验等生理生化指标测定。

69 1.3.3 菌株 R1 的生长曲线及产酸曲线绘制

70 将菌株 R1 经 MRS 液体培养基活化培养 12 h 后，按 1%（体积分数）的接种量接种于

71 装有 200 mL MRS 液体培养基的三角瓶中，37 ℃、150 r/min 培养，接种后定时取出 3 mL（3

72 个平行）培养液，分别采用 pH 计和分光光度计测定培养液的 pH 和 600 nm 处的吸光度值

73 （OD600 nm）。以时间为横坐标，以培养液的 pH 和 OD600 nm 为纵坐标，绘制其生长曲

74 线和产酸曲线。

75 1.3.4 菌株 R1 发酵上清液对常见病原菌的抑菌试验

76 菌株 R1 的抑菌试验采用牛津杯法，具体如下：将 5 种病原菌（痢疾志贺氏菌、金黄色

77 葡萄球菌、鸡肠炎沙门氏菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希氏菌）接种于液体牛肉膏蛋白胨培养

78 基中培养至对数生长期，取 200 μL 菌液分别涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上。待菌液完

79 全吸收后，在每个平板上放置 3 个灭过菌的牛津杯。将菌株 R1 用 MRS 液体培养基培养 24 h，

80 经 6 000 r/min 离心 10 min 后，取 200 μL 上清液加到牛津杯里。将平板在 37 ℃下培养 10 h

81 后观察是否有抑菌圈形成，并精确量取抑菌圈直径。通过调节发酵液 pH、在发酵液中添加

82 过氧化氢酶和蛋白酶等试验初步分析菌株 R1 抑菌的机制[24]。

83 1.3.5 菌株 R1 的体外益生特性

84 1.3.5.1 菌株 R1 对胆盐的耐受性

85 将菌株 R1 接种到 MRS 液体培养基中活化培养 12 h 后，按 1%（体积分数）的接种量

86 接种于胆盐浓度分别为 0、0.1%、0.3%、0.5%的 MRS 液体培养基中，37 ℃、150 r/min 下培

87 养 26 h，定时取样测定不同胆盐浓度下培养液的 OD600 nm。以时间为横坐标，OD600 nm

88 为纵坐标，绘制菌株 R1 在含胆盐培养基中的生长曲线，确定其对胆盐的耐受性。

89 1.3.5.2　菌株 R1 对酸度的耐受性

90 为了检测菌株 R1 在低 pH 下的生长状态，用 1 mol/L 盐酸调节 MRS 液体培养基的 pH
91 分别为 1.0、2.0、3.0、5.0。将菌株 R1 经 MRS 液体培养基活化培养 12 h 后，按 1%（体积
92 分数）的接种量分别接种于不同 pH 的 MRS 液体培养基中，37 ℃培养，定时取样测定培养
93 液的 OD600 nm。以时间为横坐标，OD600 nm 为纵坐标，绘制菌株 R1 在不同 pH 条件下的
94 生长曲线，确定其对酸度的耐受性。

95 1.3.5.3　菌株 R1 对热的耐受性

96 将菌株 R1 经 MRS 液体培养基活化培养 12 h 后，取其培养液分成 3 份，分别在 40、60、
97 80 ℃水浴条件下处理 30 min 后，利用稀释平板菌落计数法测定各个处理的活菌数，并以处
98 理前的活菌数为对照，计数处理后菌株 R1 的存活率，确定其对热的耐受性。

99 1.3.5.4　菌株 R1 对人工胃液和人工肠液的耐受性

100 人工胃液和人工肠液的配制参见文献[19]。

101 将菌株 R1 经 MRS 液体培养基活化培养 12 h 后，按 1%（体积分数）的接种量接种于
102 100 mL 人工胃液或人工肠液中，37 ℃、150 r/min 摇床培养，分别在 0、30、180 min 进行活
103 菌平板计数。

104 1.3.5.5　菌株 R1 对常用抗生素的敏感性

105 抗生素敏感性试验采用滤纸片法[25]，具体如下：将菌株 R1 用 MRS 液体培养基培养至
106 对数期后，取 200 μL 培养液均匀涂布于 MRS 固体培养基上，用无菌镊子将含有各种常用抗
107 生素的滤纸片放在平板上，将接种好的平板在 37 ℃下培养 24 h 后，观察是否有抑菌圈形成，
108 并精确量取抑菌圈直径，每种抗生素 3 个重复。滤纸片中抗生素含量分别为头孢克洛 30 μg、
109 头孢克肟 5 μg、头孢拉定 20 μg、氨苄青霉素 10 μg、青霉素 10 U、阿莫西林 20 μg、阿奇霉
110 素 15 μg、卡那霉素 30 μg、链霉素 10 μg、四环素 30 μg、痢特灵 300 μg、诺氟沙星 10 μg、
111 杆菌肽 0.04 U。

112 1.4 数据处理与分析

113 试验数据采用 Excel 2007 和 DPS v6.50 软件进行处理与分析，采用 Duncan 氏新复极差

114 法检验组间差异显著性。

115 2 结 果

116 2.1 乳酸菌的分离与鉴定

117 利用 MRS 固体培养基从自然发酵泡菜汁中分离到 1 株在生长数量上占优势的乳酸菌，

118 将其命名为菌株 R1。菌株 R1 在 MRS 固态培养基上形成的菌落为圆形，乳白色，凸起，不

119 透明，边缘整齐；经显微镜观察其菌体成杆状，单个或链状排列（图 1）。菌株 R1 呈革兰

120 氏染色反应阳性，过氧化氢酶试验、甲基红试验、V-P 试验、明胶液化试验均为阴性，能发

121 酵麦芽糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、乳糖和蔗糖产酸，其中对葡萄糖和半乳糖的利用率较

122 高。菌株 R1 在 NaCl 浓度低于 5%时生长良好，其生长最适温度和 pH 分别为 37 ℃和 5.0。

123 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 1492r 和 27f 对菌株 R1 的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增

124 和测序后，将其基因序列提交 GenBank，获得其登录号为 KY874048。通过 BLAST 比对，

125 表明菌株 R1 的 16S rRNA 基因与植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）MXG-68 的 16S rRNA

126 基因（登录号：KY750314）相似度最高，达到 100%。利用 Ribosomal Database Project 数据

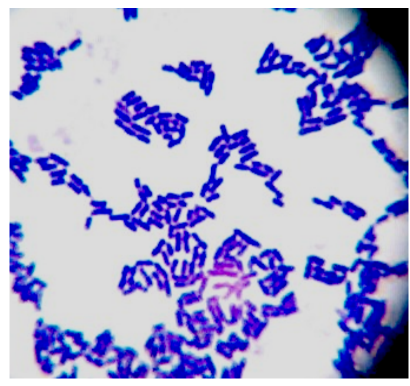
127 库的 Sequence Match 分析和 MEGA 6.0 构建其系统进化树，如图 2 所示。结果表明：菌株

128 R1 与植物乳杆菌属模式菌株 DK0 22T（登陆号：AJ640078）的亲缘关系最近。综合菌株 R1

129 的生理生化特性，将菌株 R1 确定为植物乳杆菌。

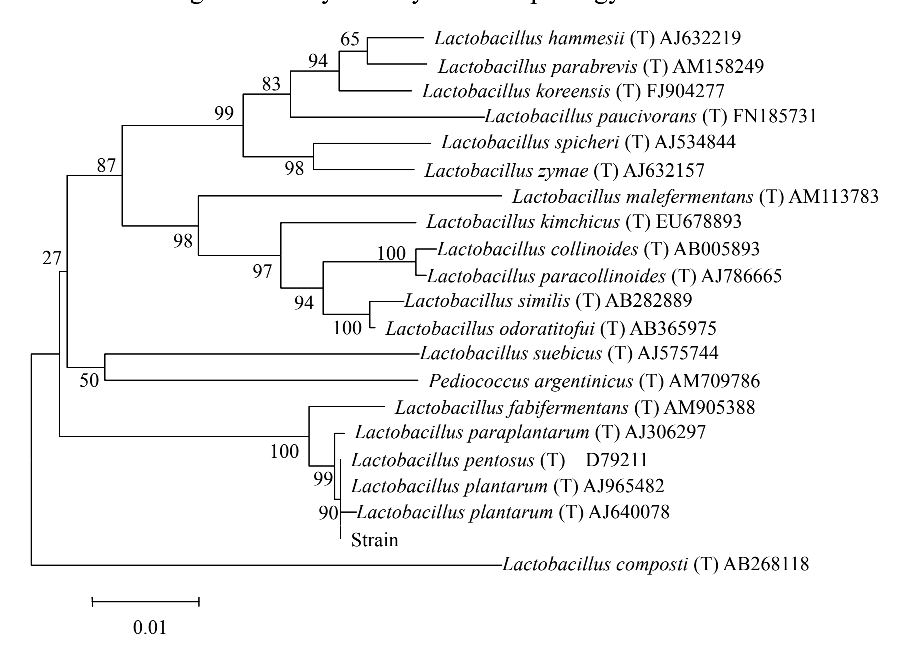
130





131 图 1 菌株 R1 的菌落及菌体形态

132 Fig.1 Colony and mycelia morphology of strain R1



133

134 *Lactobacillus hammesii*：汉默斯乳杆菌；*Lactobacillus parabrevis*：类短乳杆菌；*Lactobacillus koreensis*：

135 克瑞斯乳杆菌；*Lactobacillus paucivorans*：派瑞万斯乳杆菌；*Lactobacillus spicheri*：斯派克乳杆菌；

136 *Lactobacillus malefermentans*：坏发酵乳杆菌；*Lactobacillus collinoides*：丘状乳杆菌；*Lactobacillus*

137 *paracollinoides*：类丘状乳杆菌；*Lactobacillus paraplantarum*：类植物乳杆菌；*Lactobacillus pentosus*：戊糖

138 乳杆菌；*Lactobacillus plantarum*：植物乳杆菌；Strain R1 菌株 R1。

139 图 2 菌株 R1 的系统进化树

140 Fig.2 Phylogenetic tree of strain R1

141 2.2 菌株 R1 的生长曲线和产酸曲线

142 将菌株 R1 接种到 MRS 液体培养基中，定时取样测得菌株 R1 在接种后 0～28 h 的生长

143 曲线和产酸曲线，结果如图 3 所示。菌株 R1 在接种后 0～2 h 生长缓慢，而在 2 h 后则迅速

144 进入对数生长期，生长旺盛；12 h 后生长减慢，到 14 h 达到最大浓度（OD600 nm=2.144）；

145 并且直到 24 h 以后菌体浓度才略有降低。在菌株 R1 接种后 2 h 内培养液的 pH 变化不大，

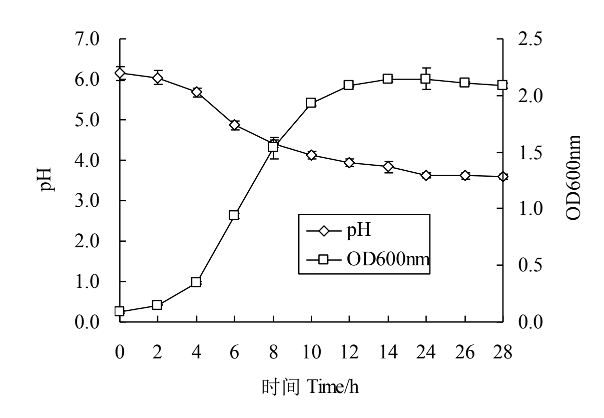
146 而在 2～12 h 内培养液的 pH 从 6.14 迅速下降到 3.95，12 h 后培养液的 pH 缓慢降低，到 28

147 h 时培养液的 pH 仅为 3.59。由上述结果可以看出，菌株 R1 生长的延滞期较短，并且可以

148 在 14 h 内达到最大生长量和较低的 pH，这一特点可以满足在利用该菌株进行发酵生产中，

149 需要在较短时间内获得大量菌体和降低发酵产品 pH 的要求。

150



151

152 图 3　菌株 R1 生长曲线和产酸曲线

153 Fig.3　Curves of growth and acid producing of strain R1

154 2.3　菌株 R1 对常见病原菌的抑制

155 乳酸菌由于生长过程中能产生乳酸或者分泌抑菌物质，往往对病原菌具有一定的抑制作

156 用，而筛选具有抑菌作用的乳酸菌也一直是乳酸菌研究的热点。本试验对菌株 R1 的发酵上

157 清液对常见大肠埃希氏菌、痢疾志贺氏菌等病原菌的抑制性进行了测定，结果表明：菌株

158 R1 的发酵上清液对试验致病菌均有很好的抑制效果，其中菌株 R1 对痢疾志贺氏菌的抑制

159 作用最强，其抑菌圈直径达到 20.50 mm，其对鸡肠炎沙门氏菌、大肠埃希氏菌、金黄色葡

160 萄球菌和铜绿假单胞菌的抑制作用依次减弱，抑菌圈直径分别为 15.67、14.17、13.33 和 12.67

161 mm；而对照组 MRS 液体培养基对致病菌无抑制作用。通过调整发酵上清液 pH 及在发酵上

162 清液中添加过氧化氢酶、蛋白酶等试验初步分析菌株 R1 的抑菌机理，结果表明：发酵上清

163 液的 pH 调至 5.0 时，其对金黄色葡萄球菌的抑菌圈显著减小（P<0.05）；当发酵上清液的

164 pH 调至 7.0 时，没有抑菌圈；在发酵上清液中添加胃蛋白酶、胰蛋白酶和过氧化氢酶后，

165 发酵上清液抑制金黄色葡萄球菌的能力略有降低（表 2）。

166 表 1 菌株 R1 发酵上清液对常见病原菌的抑制性

167 Table 1 Inhibitory of fermenlatin broth of strain R1 on common pathogenic bacteria mm

项目 Item	痢疾志贺氏菌 *Shigella dysenteriae*	鸡肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis*	大肠埃希氏菌 *Escherichia coli*	金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	铜绿假单胞菌 *Pseuduinonas aeniginasa*
抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone	20.50±1.32	15.67±2.02	14.17±0.58	13.33±0.29	12.67±0.29

168

169 表 2 菌株 R1 发酵上清液调节 pH 以及添加蛋白酶后对金黄色葡萄球菌的抑制性

170 Table 2 Inhibitory of fermenlatin broth of strain R1 after adjusting pH and addition of protease on

171 *Staphylococcus aureus*

处理 Treatments	发酵上清液 Fermentation broth（pH=3.5）	发酵液上清调 pH=5.0 Fermentation broth of pH=5.0	发酵液上清调 pH=7.0 Fermentation broth of pH=7.0	发酵上清液+胃蛋白酶 Fermentation broth+pepsin	发酵上清液+胰蛋白酶 Fermentation broth+trypsin	发酵上清液+过氧化氢酶 Fermentation broth+catalase
抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone /mm	10.67±0.58[a]	7.67±0.29[b]	0	10.17±0.29[a]	10.33±1.15[a]	10.33±0.58[a]

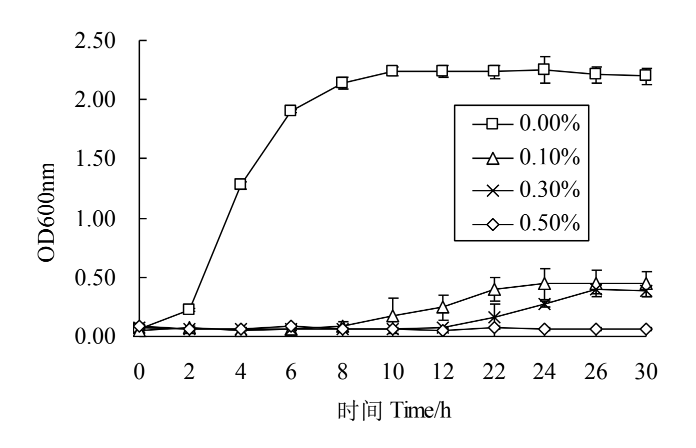
172 表中数据为平均值±标准差。同行数据肩标不同小写字母表示采用 Duncan 氏新复极差法检验在 P<0.05

173 水平差异显著。Values in the table are mean±SD. Values with different letter superscripts in the same row indicate

174 significant difference at P<0.05 level by Duncan’s new multiple range test.

175 2.4 菌株 R1 的体外益生特性

176 2.4.1 菌株 R1 对胆盐的耐受性



177

178 图 4 菌株 R1 在含胆盐培养基中的生长情况

179 Fig.4 Growth of strain R1 in culture containing bill salt

180 将菌株 R1 接种到含不同浓度胆盐的 MRS 液体培养基中，测定其对胆盐的耐受性，以

181 不添加胆盐的处理为对照，结果如图 4 所示。当胆盐浓度为 0.1%时，菌株 R1 的延滞期明显

182 比未添加胆盐时增长，达到了 8 h；8 h 后菌体数量开始呈指数增长，但与未添加胆盐时相比，

183 其增长速率明显降低，24 h 后菌体数量的增长趋于平缓达到稳定期。当胆盐浓度为 0.3%时，

184 菌株 R1 的延滞期变得更长，到 12 h 后才开始呈现指数生长状态，26 h 后达到稳定期。而当

185 胆盐浓度为 0.5%时，菌株 R1 的生长完全被抑制，到 30 h 时也未出现生长。这些结果表明

186 菌株 R1 能耐受 0.3%的胆盐浓度。

187 2.4.2 菌株 R1 对酸度的耐受性

188 将菌株R1接种到不同pH的MRS液体培养基中，测定其对酸度的耐受性，结果如图5所示。

189 当MRS液体培养基pH=5.0时，菌株R1的延滞期很短，为2 h，2 h后进入指数生长期，到8 h

190 后达到稳定期。当MRS液体培养基pH=3.0时，菌株R1的延滞期增长，4 h后菌体才表现出生

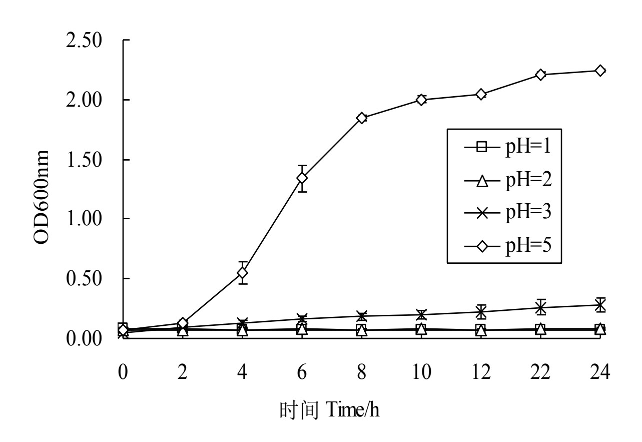
191 长，22 h后菌体生长渐缓，但菌体数量明显低于pH=5.0时。当MRS液体培养基pH=1.0、2.0

192 时，菌株R1的生长完全被抑制，到24 h后也未出现生长。通过比较可以得出，菌株在pH=5.0

193 的环境中生长状态为最佳，对pH=3.0的酸性环境也有一定的耐受性。

194

195



196

197 图 5　菌株 R1 在不同 pH 培养基中的生长情况

198 Fig.5　Growth of strain R1 in culture with different pH

199 2.4.3　菌株 R1 对热的耐受性

200 本试验将活化培养后的菌株R1经过不同温度加热处理30 min后，利用稀释平板菌落计数

201 法测定处理前后菌悬液中的活菌数，以确定其对热的耐受性，结果如表3所示。当对菌株R1

202 进行不同温度的加热处理后，其生长均受到了不同程度的影响。经40和60 ℃处理后，菌悬

203 液中R1菌株的存活率分别为94.70%和80.60%，说明菌株R1对40和60 ℃有一定的耐受性。而

204 经80 ℃处理后的菌悬液中，菌株R1的存活率仅为1.95%，这说明菌株R1对80 ℃非常敏感，

205 经过30 min的加热，菌种绝大部分被杀死。因此，对于菌株R1，在生产、运输和应用过程中

206 要避免60 ℃以上的高温。

207 表3　菌株R1对热的耐受性

208 Table 3　Resistance to heat of strain R1

项目 Items	水浴温度 Temperature of water bath/℃		
	40	60	80
处理前活菌数 Number of live bacteria before treatment/（CFU/mL）	（6.27±0.57）$\times 10^5$	（6.33±0.29）$\times 10^5$	（6.83±0.23）$\times 10^5$

处理后活菌数 Number of live bacteria after treatment/（CFU/mL）	（5.93±0.51）$\times 10^{5}$	（5.10±0.10）$\times 10^{5}$	（1.33±0.58）$\times 10^{4}$
存活率 Survival ratio/%	94.70±0.45	80.60±2.40	1.95±0.89

209

210 2.4.4 菌株 R1 对人工胃液和人工肠液的耐受性

211 根据表4可以看出，随着菌株R1在人工胃液中处理时间的延长，菌株R1不但没有死亡，

212 并且在人工胃液中表现出明显的生长，即其对人工胃液有很好的耐受性，这与2.5中菌株对

213 酸的耐受性结果相一致。

214 表 4 菌株 R1 在人工胃液和人工肠液中的生长情况

215 Table 4 Growth of strain R1 in artificial gastric juice and artificial intestinal fluid CFU/mL

项目 Items	时间 Time/h		
	0	1	3
人工胃液中活菌数 Number of live bacteria in artificial gastric juice	（4.28±0.65）$\times 10^{5}$	（5.10±0.20）$\times 10^{5}$	（8.35±0.46）$\times 10^{5}$
人工肠液中活菌数 Number of live bacteria in artificial intestinal juice	（2.58±0.03）$\times 10^{6}$	（2.08±0.18）$\times 10^{6}$	（3.66±0.10）$\times 10^{6}$

216 由表 4 可以看出，菌株 R1 在人工肠液中处理不同时间后，其活菌数在 0~3 h 内从 2.58×10^{6}

217 CFU/mL 增长到了 3.66×10^{6} CFU/mL，即菌株 R1 在人工肠液中能够保持增长的状态，这说

218 明菌株 R1 对人工肠液具有较好的耐受性。

219 2.4.5 菌株 R1 对常用抗生素的敏感性

220 由表 5 可以看出，菌株 R1 对各种常用抗生素的敏感性不同。菌株 R1 对于治疗呼吸道

221 感染常用的抗生素，如阿莫西林、氨苄西林和头孢类抗生素敏感性强；对治疗胃肠道感染用

222 的抗生素痢特灵的敏感性较弱，而对诺氟沙星和杆菌肽则不敏感。此外，菌株 R1 对卡那霉

223 素、链霉素和四环霉素等抗生素也不敏感。

224 表 5 菌株 R1 对常用抗生素的敏感性

225 Table 5 Sensitivity of strain R1 to common antibiotics mm

抗生素 Antibiotics	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone	抗生素 Antibiotics	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone
头孢克洛 Cefaclor	17.33±1.15	卡那霉素 Kanamycin	0
头孢克肟 Cefixime	21.67±1.52	链霉素 Streptomycin	0
头孢拉定 Cephradine	17.33±0.58	四环素 Tetracycline	0
氨苄西林 Ampicillin	21.00±1.73	痢特灵 Furazolidone	13.00±1.00
青霉素 Penicillin	11.00±1.00	诺氟沙星 Norfloxacin	0
阿莫西林 Amoxicillin	23.33±0.58	杆菌肽 Bacitracin	0

226 3 讨 论

227 3.1 菌株 R1 的鉴定结果

228 对分离到的微生物菌株进行分类学地位鉴定，是认识某种微生物的首要的且必须的工

229 作，而 16S rRNA 基因序列分析是目前对细菌进行分类学地位鉴定最准确且最快速的方法。

230 本研究利用 NCBI 数据库的 BLAST 功能，对菌株 R1 的 16S rRNA 基因序列进行分析，发现

231 其与数据库中很多植物乳杆菌的 16S rRNA 基因序列同源性都达到了 100%，遂将其初步鉴

232 定为植物乳杆菌。以往的研究中，已有大量植物乳杆菌菌株从自然发酵的蔬菜制品中被分离

233 到[6,12,18]，本试验得出的菌株 R1 亦是从自然发酵的泡菜汁中分离得到的，并且菌株 R1 还是

234 其中的优势菌株。此外，菌株 R1 的菌落菌体形态特征、革兰氏染色反应、部分生理生化特

235 征以及糖发酵试验结果均与植物乳杆菌的特征[23]相符，所以可以确定本试验分离出的菌株

236 R1 为植物乳杆菌。

237 3.2 菌株 R1 的抑菌性

238 植物乳杆菌在生长繁殖过程中不仅能够产生大量的有机酸[3,26]，甚至有些菌株可以产生
239 特有的乳酸杆菌素[2,9]，这些物质都是很好的生物防腐剂，可以通过降低动物体内的 pH 或生
240 物拮抗作用等方式阻止和抑制病原微生物的侵入和定植。通过研究发现，菌株 R1 对常见病
241 原菌痢疾志贺氏菌、鸡肠炎沙门氏菌、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的生
242 长均有抑制性，且其抑菌性明显强于某些已报到的其他类型乳酸菌菌株[7,15]。通过调节发酵
243 液 pH、添加过氧化氢酶、蛋白酶等试验对菌株 R1 的抑菌机理进行初步分析，认为菌株 R1
244 对病原菌的抑制作用主要是依赖其分泌的乳酸等酸性代谢产物，这与菌株 R1 具有较好产酸
245 能力的特点相吻合。张艳萍等[26]亦报道，11 株对大肠杆菌有较好抑制作用的乳酸菌均具有
246 较好的产酸能力。马妙莲等[27]经气相色谱-质谱联用仪和高效液相色谱初步分析，发现 1 株
247 具有广谱抑菌活性的戊糖乳杆菌的发酵上清液中含有乳酸、乙酸、琥珀酸、柠檬酸、棕榈酸、
248 油酸、硬脂酸和亚油酸等多种抑菌成分。菌株 R1 发酵上清液中具有抑制作用的酸性物质成
249 分还需进一步鉴定。

250 3.3 菌株 R1 的体外益生特性

251 动物胃液的 pH 通常在 3.0 左右，而动物肠道内环境却是碱性的，pH 大约为 7.6；并且
252 动物消化道和肠道中都含有一定浓度的胆盐和胆汁酸，益生菌要想在动物消化道存活并增
253 殖，必须既能够耐受酸性环境，又能耐受碱性和高渗透压的环境[19]。本试验对菌株 R1 对酸
254 性环境、含胆盐环境以及人工胃液和人工肠液的耐受性均进行了测定，结果表明：菌株 R1
255 可以耐受 pH=3.0 的酸性环境以及含 0.3%的胆盐环境；并且，与已报到的植物乳杆菌 GF103[19]
256 和 DJ-04[28]等菌株相比，菌株 R1 在人工胃液和人工肠液环境中的生长不但没有受到影响，
257 甚至可以保持良好的增长状态，此特点说明菌株 R1 较其他菌株更具有在动物体内存活的潜
258 力。

259 此外，益生菌在应用过程中亦经常会接触加热的过程或者宿主由于生病或预防目的使用

260 抗生素的情况，致使其生长被抑制，很难发挥好的益生效果，因此，了解菌株对高温和常用
261 抗生素的敏感性，对于指导其正确使用和更好地发挥其益生作用具有重要意义。本研究对菌
262 株 R1 对高温和常用抗生素的敏感性亦进行了测定，结果表明：菌株 R1 可以耐受 60 ℃的
263 高温，并且仅对青霉素类和头孢类抗生素敏感，而对诺氟沙星、杆菌肽、卡那霉素、链霉素
264 和四环霉素等抗生素有抗性。

265 4 结 论

266 本研究从自然发酵的泡菜汁中分离到 1 株乳酸菌 R1，其 16S rRNA 基因与植物乳杆菌
267 MXG-68 的 16S rRNA 基因（登录号：KY750314）相似度达到 100%；该菌株发酵上清液对
268 常见病原菌痢疾志贺氏菌、鸡肠炎沙门氏菌、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞
269 菌的抑菌圈直径可以分别达到 20.50、15.67、14.17、13.33 和 12.67 mm；该菌株具有很好的
270 产酸性能，且可以耐受 pH 3.0 的低酸性环境以及 60 ℃的热处理，其对人工胃液和人工肠液
271 亦有很好的耐受性；该菌株对头孢类和青霉素类抗生素敏感。

272 参考文献：

273 [1] SAARELA M,MOGENSEN G,FONDÉN R,et al.Probiotic bacteria:safety,functional and
274 technological properties[J].Journal of Biotechnology,2001,84(3):197–215.
275 [2] 李东霞,庞会利,王雁萍,等.高抗菌活性乳酸菌的筛选及菌种鉴定[J].饲料工
276 业,2013,34(19):13–17.
277 [3] 肖仔君,钟瑞敏,陈惠音,等.植物乳杆菌的生理功能与应用[J].中国食品添加
278 剂,2005(2):87–89.
279 [4] 于长青,张丽娜,邓旭明,等.降胆固醇植物乳杆菌的紫外诱变选育[J].微生物学通
280 报,2008,35(9):1461–1465.
281 [5] 胡梦坤,岳喜庆.植物乳杆菌 LP1103 的筛选及其降胆固醇作用机理的研究[J].食品科
282 学,2008,29(6):226–229.

283 [6] 于志会,李常营,张雪,等.酸菜中降胆固醇功能植物乳杆菌的体外筛选[J].食品与生物技术
284 学报,2011,30(3):398–402.
285 [7] 陈大卫,郭飞翔,顾瑞霞,等.具有降胆固醇能力的人源乳酸菌筛选[J].现代食品科
286 技,2014,30(3):114–120.
287 [8] 刘伊,戚薇,巩培,等.抗李斯特细菌植物乳杆菌的抑菌活性物质特性[J].食品研究与开
288 发,2009,30(11):72–74.
289 [9] 郭颖,杨相宜,单艺,等.一株植物乳杆菌的鉴定及其抑菌特性研究[J].中国乳品工
290 业,2013,41(8):12–16.
291 [10] HAI J Y,CHEN Y F,YANG H J,et al.Screening for *Lactobacillus plantarum* with potential
292 inhibitory activity against enteric pathogens[J].Annals of
293 Microbiology,2015,65(3):1257–1265.
294 [11] RUMJUANKIAT K,PEREZ RH,PILASOMBUT K,et al.Purification and characterization
295 of a novel plantaricin,KL-1Y,from *Lactobacillus plantarum* KL-1[J].World Journal of
296 Microbiology and Biotechnology,2015,31(6):983–994.
297 [12] 朱军莉,赵进,朱雅霏,等.自然发酵蔬菜制品中降解亚硝酸盐乳酸菌的分离与鉴定[J].中
298 国酿造,2015,34(6):39–42.
299 [13] 陈盼莹,曾小群,潘道东,等.腌制食品中亚硝酸盐及其乳酸菌降解的研究进展[J].现代化
300 农业,2014(12):20–22.
301 [14] YAN P M,XUE W T,TAN S,et al.Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on
302 the nitrite concentration of fermenting Chinese Paocai[J].Food Control,2008,19(1):50–55.
303 [15] 杨红亚,崔红玉,闫帅,等.黑龙江散养鸡中一株乳酸菌的分离鉴定及益生特性和抗病毒
304 特性研究[J].中国预防兽医学报,2013,35(6):444–448.
305 [16] PARK J,PARK S C.Characterization and growth inhibition against fish pathogenic bacteria

306 of a novel *Lactobacillus plantarum* PL13[J].Journal of Veterinary Pharmacology and
307 Therapeutics,2015,38:87–88.
308 [17] HUANG R H,TAO X Y,WAN C X,et al.*In vitro* probiotic characteristics of *Lactobacillus*
309 *plantarum* ZDY 2013 and its modulatory effect on gut microbiota of mice[J].Journal of
310 Dairy Science,2015,98(9):5850–5861.
311 [18] 陈晓平,刘华英,魏小川,等.自然发酵酸菜汁中乳酸菌的分离筛选与鉴定研究[J].食品科
312 学,2006,27(2):91–94.
313 [19] 董晓丽,张乃锋,周盟,等.一株乳酸菌 GF103 的分离鉴定及体外益生效果评价[J].动物营
314 养学报,2012,24(9):1832–1838.
315 [20] CAGGIA C,DE ANGELIS M,PITINO I,et al.Probiotic features of *Lactobacillus* strains
316 isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses[J].Food
317 Microbiology,2015,50:109–117.
318 [21] 秦翠丽,李松彪.新编微生物学实验技术[M].北京:兵器工业出版社,2014:186.
319 [22] 袁林,吴清平,吴克刚,等.广谱抑菌物质产生菌 GX-21 的筛选及鉴定[J].现代食品科
320 技,2014,30(12):68–73,60.
321 [23] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:370–373.
322 [24] 鲁晶晶,王远亮.植物乳杆菌 LJ-3 代谢产物的抑菌成分性质鉴定[J].农产品加工：学
323 刊,2014(7):54–57.
324 [25] 李平兰,潘伟好,吕艳妮,等.微生态制剂中常用乳酸菌对抗生素的药敏性研究[J].中国农
325 业大学学报,2004,9(1):15–20.
326 [26] 张艳萍,李雪平,杜志琳,等.具有抑菌作用的乳酸菌菌株筛选[J].饲料研究,2015(7):16–19.
327 [27] 马妙莲,赵静,陈晓琳,等.具有广谱抑菌活性乳酸菌的筛选及抑菌物质分析[J].食品科
328 学,2012,33(1):162–165.

329 [28] 李清,王英,刘小莉,等.一株广谱抑菌活性乳酸菌的筛选及特性研究[J].微生物学通
330 报,2015,42(2):332–339.
331

332 Isolation and Identification of *Lactobacillus plantarum* from Naturally Fermented Pickle Juice and
333 Its Probiotic Properties *in Vitro*[2]

334 HOU Ying WANG Weiyu NIU Mingfu MA Liping QIN Cuili GONG Qiang
335 (*College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Henan*
336 *Engineering Research Center of Food Material, Luoyang Engineering and Technology Research*
337 *Center of Microbial Fermentation, Luoyang* 471023*, China*)

338 Abstract: A dominant lactic acid bacteria was isolated from natural fermented pickle juice by MRS
339 solid medium and it was named strain R1. Strain R1 was identified as *Lactobacillus plantarum* by
340 the analysis of its 16S rRNA gene, physiological and biochemical characteristics and sugar
341 fermentation test. Strain R1 had a strong ability to produce acid and the pH of the MRS fluid
342 medium inoculated strain R1 decreased from 6.14 to 3.59 within 24 h. The fermentation
343 supernatant of strain R1 could inhibit the growth of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*,
344 *Pseuduinonas aeniginasa*, *Salmonella enteritidis*, and *Escherichia coli*. *In vitro* probiotic tests
345 showed that strain R1 could survive in the medium containing 0.3% salt bile or with pH 3.0. The
346 growth of strain R1 was not affected after it was heated by 60℃ for 30 min. Strain R1 also had
347 good tolerance to artificial gastric juice and artificial intestinal juice. Strain R1 was sensitive to the
348 antibiotics of the kinds of cephalosporins and penicillins, and was insensitive to norfloxacin,
349 bacitracin, kanamycin, streptomycin.

350 Key words: *Lactobacillus plantarum*; antibacterial activity; isolation; identification; probiotic

Author, HOU Ying, associate professor, E-mail: houying76@126.com （责任编辑 菅景颖）

351 properties

352